

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 9 月 27 日 (27.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/71025 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/37, 1/00, G01N 33/52 東京都新宿区大京町12-35 クレール外苑101 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/02345
- (22) 国際出願日: 2001 年 3 月 23 日 (23.03.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-83176 2000 年 3 月 24 日 (24.03.2000) JP
特願2000-187061 2000 年 6 月 22 日 (22.06.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 富士写真フイルム株式会社 (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) [JP/JP]; 〒250-0193 神奈川県南足柄市中沼210番地 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 根守良一 (NEMORI, Ryoichi) [JP/JP]. 山本正義 (YAMAMOTO, Masayoshi) [JP/JP]. 中村剛希 (NAKAMURA, Kouki) [JP/JP]; 〒250-0193 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社 足柄研究所内 Kanagawa (JP). 岡田保典 (OKADA, Yasunori) [JP/JP]; 〒160-0015
- (74) 代理人: 今村正純, 外 (IMAMURA, Masazumi et al.) ; 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FILMS FOR ASSAYING PROTEASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: プロテアーゼ活性測定用薄膜

(57) Abstract: Films for assaying protease activity which are crosslinked and/or substantially water-insoluble films formed on the surface of a support and contain one or more substances selected from the group consisting of transferrin derivatives and albumin derivatives. By using these films, protease activities originating in specific proteases (matrix metalloprotease 7, etc.) can be selectively assayed.

(57) 要約:

プロテアーゼ活性を測定するための薄膜であって、支持体表面に形成され、トランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の物質を含有する架橋された及び/又は実質的に水に溶けない薄膜。マトリックスメタロプロテアーゼ 7 などの特定のプロテアーゼに由来するプロテアーゼ活性を選択的に測定することができる。

WO 01/71025 A1

明 細 書

プロテアーゼ活性測定用薄膜

技術分野

本発明は、プロテアーゼ活性を測定するための薄膜、及びプロテアーゼ活性の測定方法に関するものである。より具体的には、癌細胞の浸潤活性や転移活性などの癌の悪性度、歯周炎などの歯周病の進行度、リウマチ性関節炎、動脈硬化巣などにおける破壊性病変などの正確な診断を可能にするプロテアーゼ活性測定用の薄膜、及びプロテアーゼ活性の測定方法に関するものである。

背景技術

癌細胞の浸潤や転移、歯周炎などの歯周病の進行、リウマチ性関節炎などにおける組織破壊の進行、創傷治癒過程、個体発生過程などにおいて、マトリックスメタロプロテアーゼ、プラスミノゲンアクティベーターなど種々のプロテアーゼが関与することが知られており、それらのプロテアーゼの検出及び定量方法として、抗体を用いたイミュノアッセイ法、イミュノブロットィング法、電気泳動ザイモグラフィ法などが知られている。また、組織中におけるプロテアーゼの活性を測定する方法として、Science, Vol. 170, pp. 749-751, 1970、The FASEB Journal, Vol. 9, July, pp. 974-980, 1995、W097/32035、又は特願平 11-365074 号明細書に示されるいわゆる in situ zymography 法が知られている。

国際公開 W097/32035 号公報にはプロテアーゼ基質と硬膜剤とを含み支持体上に形成された薄膜を用いてプロテアーゼを検出する方法が開示されている。この方法では、代表的なプロテアーゼ基質としてゼラチンを用い、プロテアーゼによりゼラチン薄膜上に形成される消化痕を測定することによって、プロテアーゼを測定できる。また、Science, Vol. 170, pp. 749-751, 1970 にはゼラチンとグルタルアルデヒドとを含み支持体上に形成された薄膜を用いてプロテアーゼを検出す

る方法が開示されている。この方法では、プロテアーゼ基質としてゼラチンを用い、トリプシン様プロテアーゼによりゼラチン薄膜上に形成される消化痕を測定することによって、プロテアーゼを測定できる。

しかしながら、ゼラチン薄膜を用いた場合には、マトリックスメタロプロテアーゼ（以下、「MMP」と略す場合がある）2、3、7、及び9や、セリンプロテアーゼ（トリプシン、プラスミン）などの複数のプロテアーゼが薄膜に対して消化活性を有していることから、癌細胞や炎症性細胞などのほか、例えば消化管組織における消化酵素によっても薄膜が消化される。このため、プロテアーゼ基質としてゼラチンを用いると、疾患に関連したプロテアーゼの活性を選択的に検出することができないという問題があった。

Analytical Biochemistry, 176, pp. 261-264, 1989 には、ウシ血清アルブミンのジスルフィド結合を還元し、生成したチオール基に色素を結合させたタンパク質を膜に吸着させ、その膜を用いてカテプシンD、トリプシン、キモトリプシン、パパインの活性を検出できることが示されているが、MMPの測定に関しては記述されていない。

一方、近年、主として癌細胞から分泌されるMMPとしてMMP 7が注目されており、MMP 7の選択的な検出が望まれている。

発明の開示

本発明の課題は、癌細胞の浸潤活性や転移活性などの癌の悪性度、歯周炎などの歯周病の進行度、リウマチ性関節炎、動脈硬化巣などにおける破壊性病変などの正確な診断を可能にするプロテアーゼ活性測定用の薄膜、及びプロテアーゼ活性測定方法を提供することにある。より具体的には、特定のプロテアーゼにより選択的に消化痕が形成されるプロテアーゼ活性測定用の薄膜、及び該薄膜を用いたプロテアーゼ活性の測定方法を提供することが本発明の課題である。また、MMP 7により選択的に消化痕が形成されるプロテアーゼ活性測定用の薄膜、及び該薄膜を用いたプロテアーゼ活性の測定方法を提供することも本発明の課題であ

る。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、プロテアーゼ基質としてトランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれる物質を含む薄膜が、ゼラチンに比べてMMP 7以外のプロテアーゼ（例えば、MMP 2、MMP 3、MMP 9など）による消化を受けにくいことを見出した。また、この結果、上記の物質を含む薄膜に対して、MMP 7が選択的に消化痕を形成することを見いだした。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は、プロテアーゼ活性を測定するための薄膜であって、支持体表面に形成され、トランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれる1又は2以上の物質を含有する架橋された及び／又は実質的に水に溶けない薄膜を提供するものである。

この発明の好ましい態様によれば、さらにプロテアーゼ・インヒビターを含む薄膜、及びさらに硬膜剤を含む薄膜が提供される。プロテアーゼ・インヒビターとしては、マトリックスメタロプロテアーゼ・インヒビター、セリンプロテアーゼ・インヒビター、又はシステインプロテアーゼ・インヒビターが好ましい。上記薄膜は、単層又は重層のいずれでもよい。

これらの発明の好ましい態様によれば、さらに色素を含む上記の薄膜、及び固体分散又は乳化分散された色素を含む上記の薄膜が提供される。色素としては、可視吸収を有する色素、又は蛍光色素が好ましい。色素は単独で用いてもよく、あるいは複数の色素を組み合わせ用いてもよい。薄膜が複数の層から構成される場合には、各層に同じ色素が含まれていてもよく、あるいは各層に異なる色素が含まれていてもよい。

本発明のさらに好ましい態様によれば、架橋されたトランスフェリン誘導体、好ましくは硬膜剤により架橋されたトランスフェリン誘導体を含む上記の薄膜が提供される。また、トランスフェリン誘導体がジスルフィド結合由来の硫黄原子に置換基を導入した誘導体である上記の薄膜；トランスフェリン誘導体がカルボキシメチルトランスフェリンである上記の薄膜が提供される。

また、アルブミン誘導体がジスルフィド結合由来の硫黄原子に置換基を導入した誘導体である上記の薄膜；アルブミン誘導体がカルボキシメチル化血清アルブミン、N-アルキルサクシンイミド化血清アルブミン、及びS-カルボキシメチル化コンアルブミンからなる群から選ばれる1又は2以上の誘導体である上記の薄膜が本発明により提供される。

上記薄膜は膜厚が $0.5\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ であることが好ましく、プラスチック又はガラス製の支持体の上に形成され、乾燥されたものが好ましい。プロテアーゼとしては、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）7が好ましい。

また、本発明の別の観点によれば、プロテアーゼ活性の測定方法であって、

- (1) 上記薄膜に対してプロテアーゼを含む試料を接触させる工程；及び
- (2) プロテアーゼ活性により該薄膜に形成された消化痕を検出する工程を含む方法が提供される。

この方法の好ましい態様によれば、薄膜を洗浄した後に消化痕を検出する上記の方法；薄膜を染料で染色した後に消化痕を検出する上記の方法；試料が組織切片又は細胞を含む生体試料である上記の方法；及び薄膜上の組織切片又は細胞の細胞核を薄膜と識別できる色の染料で染色する工程を含む上記の方法が提供される。生体組織としては、組織切片、細胞、又は体液などを用いることができる。例えば、試料を薄膜に接触させた後、室温から 50°C の間の温度で例えば10分から30時間の間インキュベートしてプロテアーゼにより薄膜の一部を消化させ、必要に応じて薄膜を染料で染色した後、薄膜上の消化痕を検出することによりプロテアーゼ活性を測定することができる。

この発明の好ましい態様によれば、生体試料が、ヒトを含む哺乳類動物、好ましくは患者、疾患が疑われる哺乳動物、実験動物などから分離・採取した生体試料である上記方法が提供される。生体試料として、組織片などの固形試料のほか、組織から吸引により採取した細胞又は組織片を含む試料、血液、リンパ液、唾液などの非固形試料などを用いることができる。例えば、生体試料が癌組織、リンパ節、歯周病組織、歯肉溝滲出液、破壊性病変組織、または液（例えばリウマチ

性病変の関節液または歯槽膿漏組織抽出液)、胸水、腹水、脳脊髄液、乳腺異常分泌液、卵巣嚢胞液、腎臓嚢胞液、脾液、喀痰、血液あるいは血球である上記方法は本発明の好ましい態様である。連続した切片を用いる方法では生体試料として組織切片を用いることができる。

消化痕の検出を顕微鏡下又は目視により行う上記方法;又は画像処理装置を用いて消化痕の定量あるいは数値化を行う上記方法は好ましい態様である。また、薄膜の洗浄を水、メタノール、エタノール、界面活性剤溶液、グリセリン水溶液、ポリエチレングリコール水溶液、あるいはそれらの混合物により行うことが好ましい。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において「～」で示される数値範囲は、下限及び上限の数値を含む範囲である。本明細書において用いられる測定という用語は、定性及び定量を含めて最も広義に解釈されるべきである。本発明のプロテアーゼ活性の測定方法では、試料中に含まれるプロテアーゼによって薄膜中のプロテアーゼ基質(トランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれる1又は2以上の物質)が消化され、薄膜に消化痕が形成される。本明細書において「消化」とはプロテアーゼによるトランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれる物質の酵素的分解を意味する。

その後、例えば、薄膜を染色することにより消化痕は光学濃度の低い部分として顕微鏡下で検出することができ、試料中のプロテアーゼ活性の存在を検出することができる。また、薄膜を洗浄することによって消化された部分の基質や色素が洗い流され、消化痕の検出が容易になる。洗浄には、水、メタノール、エタノール、界面活性剤溶液、グリセリン水溶液、ポリエチレングリコール水溶液、あるいはそれらの混合物を用いることができる。色素を含む薄膜を用いる場合には消化痕の検出のために洗浄を行うことが好ましい。

本発明の対象となるプロテアーゼとしては、例えば、マトリックス・メタロプ

ロテアーゼ、セリンプロテアーゼ 及びシステインプロテアーゼを挙げることができ、これらの酵素については、鶴尾隆編「癌転移の分子機構」、pp. 92-107、メジカルビュー社、1993 年発行に詳細に説明されている。これらのうち、MMP-7 は本発明の方法に最も好適な測定対象である。

トランスフェリン誘導体あるいはアルブミン誘導体を含む薄膜ではMMP-2、MMP-3、又はMMP-9による消化を受けにくいことから、MMP-7についてより高い選択性を要求される測定に好適である。また、プロテアーゼとしてMMP-7のほか、カテプシンD、トリプシンなどのシステインプロテアーゼあるいはセリンプロテアーゼを対象に測定を行うことができる。

本発明で用いるトランスフェリンとしてはヒト、牛、豚、あるいはその他の動物由来のトランスフェリン、あるいはそれらと相同のアミノ酸配列を持ち、遺伝子工学的に製造されたものを好ましく用いることができる。ホロあるいはアポ型のトランスフェリンは、いずれも好ましく用いることができる。トランスフェリン誘導体としては、ジスルフィド結合の過ギ酸酸化物、ジスルフィドの亜硫酸分解によるS-スルホシステイン誘導体、還元剤によりジスルフィドを切断しアルキル化剤によりS-アルキル化したものなどを好ましく用いることができる。アルキル化剤としてはヨード酢酸、ヨード酢酸アミドのほか、以下に示す化合物を好ましく用いることができる。

酢酸 2-プロモエチルエステル、(S)-(+)-2-アミノ-4-プロモ酪酸ヒドロプロミド、プロモアセトアルデヒドジエチルアセタール、2-プロモアセトアミド、プロモ酢酸 t-ブチルエステル、プロモ酢酸メチルエステル、プロモアセトニトリル、アリルプロミド、2,2-ビス(プロモメチル)-1,3-プロパンジオール、プロモアセトアルデヒドジメチルアセタール、プロモ酢酸、プロモ酢酸エチルエステル、プロモアセトン、4-(プロモアセチルアミノ)安息香酸、4-(プロモアセチル)モルホリン、4-プロモ-2-ブタンスルホン酸ナトリウム塩、4-プロモ-1-ブタノール、4-プロモ-1-ブテン、2-プロモ-N-tert-ブチル-3,3-ジメチルブチルアミド、4-プロモ-n-酪酸、3-プロモブチロニトリル、3-プロモ-2-(プロモメチル)プロピオン酸、

1-ブromo-2-ブタノール、1-ブromo-2-ブタノン、4-ブromoブチルアセテート、2-ブromo-n-酪酸、 α -ブromo- γ -ブチロラクトン、4-ブromoブチロニトリル、((1R)-(endo, anti))-(+)-3-ブromoカンファ-8-スルホン酸アンモニウム塩、(1S)-(+)-3-ブromoカンファ-10-スルホン酸水和物、2-ブromo-2-シアノ-N,N-ジメチルアセトアミド、2-ブromoエタンスルホン酸ナトリウム塩、2-ブromoエチルアミンヒドロブロミド、4-(2-ブromoエチル)安息香酸、2-ブromoエチルメチルエステル、(+)-3-ブromoカンファ-8-スルホン酸アンモニウム塩、ブromoコリンブロミド、1-ブromo-2,2-ジメトキシプロパン、2-ブromoエタノール、4-(2-ブromoエチル)ベンゼンスルホン酸、2-(2-ブromoエチル)-1,3-ジオキサン、2-ブromoエチルホスホン酸ジエチルエステル、2-ブromoイソ酪酸、2-ブromoマロンアミド、2-(ブromoメチル)アクリル酸、2-ブromoメチル-1,3-ジオキソラン、2-(ブromoメチル)-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール、ブromoニトロメタン、 α -ブromoフェニル酢酸、2-ブromoイソ吉草酸、ブromoマロン酸ジエチルエステル、4-(ブromoメチル)安息香酸、5-ブromo-1-メチルヒダントイン、4-ブromoメチルフェニル酢酸、2-ブromo-2-ニトロ-1,3-プロパンジオール、3-ブromo-1,2-プロパンジオール、3-ブromoプロパンスルホン酸、1-ブromo-2-プロパノール、3-ブromoプロピオンアルデヒドジエチルアセタール、2-ブromoプロピオンアミド、2-ブromoプロピオン酸、2-ブromoプロピオニトリル、3-ブromoプロピルアミンヒドロブロミド、3-ブromoプロパンスルホン酸ナトリウム塩、3-ブromo-1-プロパノール、3-ブromoプロピオンアルデヒドジメチルアセタール、3-ブromoプロピオンアミド、3-ブromoプロピオン酸、3-ブromoプロピオニトリル、(3-ブromoプロピル)ホスホン酸、(3-ブromoプロピル)トリメチルアンモニウムブロミド、3-ブromoピルビン酸水和物、2-ブromo-1,1,1-トリエトキシプロパン、2-ブromo-n-吉草酸、ジブromoアセトニトリル、エピブromoヒドリン、N-メチルスルホニル-3-ブromoプロピオンアミド、3-ブromoピルビン酸、ブromo琥珀酸、11-ブromoウンデカン酸、ブromoバレリルウレア、2,3-ジブromo-1-プロパノール、ブromoピルビン酸エチル、テトラヒドロフルフリルブロミド、N-(3-カルボキシエチル)マレアミド酸、cis-アコ

ニット酸、アクリル酸 2-カルボキシエチルエステル、フマル酸モノエチルエステル、マレイン酸、マレイン酸モノアミド、マレイン酸モノメチルエステル、N-(3-カルボキシプロピル)マレアミド酸、アクリル酸、アクリロニトリル、2-(アクリロイルアミノ)イソ酪酸、イタコン酸、マレイン酸 2 ナトリウム塩、マレイン酸モノエチルエステル、N-メチルマレイン酸モノアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、硫酸水素 2-アミノエチル、(2-ブロモエチル)メチルサルフェート、1,4-ブタンスルトン、1,2:5,6-ジ-O-イソプロピリデン-3-O-(メチルスルホニル)- α -D-グルコフラノース、2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イルメチル p-トルエンスルホネート、メタクリル酸 3-スルホプロピルエステルカリウム塩、(2-(アクリルオキシ)エチル)トリメチルアンモニウムメチルサルフェート、ベンゼンスルホン酸 2-メトキシエチルエステル、1,3-ブタンジオールサイクリックスルフェート、シアノメチルベンゼンスルホネート、ジメチル(4S,5S)-1,3,2-ジオキサチオラン-4,5-ジカルボキシレート 2,2-ジオキシド、1,3,2-ジオキサチオラン 2,2-ジオキシド、(2-(メタクリロイルオキシ)エチル)トリメチルアンモニウムメチルサルフェート、N-(2-ヨードエチル)-トリフルオロアセトアミド、ヨードメタン、2-ヨードアセトアミド、ヨードアセトニトリル、2-ヨードエタノール、3-ヨードプロピオン酸、ヨード酢酸ナトリウム、ヨード酢酸、4-ヨード酪酸、3-ヨードプロパンスルホン酸ナトリウム塩、リチウムヨード酢酸、メタンスルホン酸エトキシカルボニルメチルエステル、2-メチルプロパンスルトン、1,3-プロパンジオールサイクリックスルフェート、プロパルギルベンゼンスルホネート、テトラエチレングリコールモノオクチルエーテルメタンスルホネート、p-トルエンスルホン酸ペンタフルオロベンジルエステル、p-トルエンスルホン酸 2-(2-n-プロポキシエトキシ)エチルエステル、メタンスルホン酸 2-メトキシエチルエステル、メチルプロパンスルトン、プロパンスルトン、3-スルホプロピルアクリレートカリウム塩、p-トルエンスルホン酸 2-エトキシエチルエステル、p-トルエンスルホン酸プロパルギルエステル、2-(p-トルエンスルホニル)エタノール、5'-トシルアデノシン、アジリジン-2-カルボン酸メチルエステル、エチレンイミン、プロピ

レンイミン、1-(2-ヒドロキシエチル)エチレンイミン、4-ビニルピリジン、ビニルスルホン酸ナトリウム塩、モノエチルフマル酸カリウム塩、プロピオール酸、trans, trans-ムコン酸、マレイミド、N-メチルマレイミド、N-エチルマレイミド、N-ヒドロキシマレイミド、N-カルバモイルマレイミド、及び3-マレイミドプロピオン酸。

トランスフェリン誘導体の作製方法としては、例えば「新生化学実験講座 1、タンパク質 II、一次構造、p. 75-80」および「新生化学実験講座 3、糖質 II、プロテオグリカンとグルコサミノグリカン、p. 249-250」、Methods in enzymology の Vol. 11(1967) P. 199-255、315-317、541-548に記載されている方法を用いることができる。例として還元カルボキシメチル化によるカルボキシメチルトランスフェリン作製の代表的な方法を示す。まずトランスフェリンを7 Mグアニジン塩酸塩および10 mM EDTAを含む0.5 Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) に溶解し、pHを8.3以上に調整する。窒素置換した後ジチオスレイトールを加え、トランスフェリンのジスルフィド結合を還元する。さらにヨード酢酸を加え遮光下で反応させてS-アルキル化をおこなった後、透析あるいはゲル濾過により脱塩し、目的物を得る。ヨード酢酸の代わりに他のS-アルキル化剤を用いればそれぞれの誘導体を得ることができる。また、過ギ酸酸化法および亜硫酸分解法については、前記の「新生化学実験講座 1、タンパク質 II、一次構造」p. 76に記載されている方法を用いることができる。

アルブミン誘導体を製造するためのアルブミン原料としては、ヒト、牛、豚、鶏、ウサギ、ラット、モルモット、マウス、ウマあるいはその他の動物由来のアルブミン、及びコンアルブミンあるいはそれらと相同のアミノ酸配列を持ち、遺伝子工学的に製造されたものを好ましく用いることができる。アルブミン誘導体としては、ジスルフィド結合の過ギ酸酸化物、ジスルフィドの亜硫酸分解によるS-スルホシステイン誘導体、還元剤によりジスルフィドを切断しアルキル化剤によりS-アルキル化したものなどを好ましく用いることができる。誘導体化していないアルブミンはマトリックス・メタロプロテアーゼによる分解を受けにく

く、プロテアーゼ基質として好ましくない。アルブミン誘導体を製造するためのアルキル化剤としては、ヨード酢酸、ヨード酢酸アミドのほか、トランスフェリンのアルキル化剤として上記に具体的に例示した化合物を好ましく用いることができる。

アルブミン誘導体の作製方法としては、例えば「新生化学実験講座 1、タンパク質 II、一次構造、p. 75-80」および「新生化学実験講座 3、糖質 II、プロテオグリカンとグルコサミノグリカン、p. 249-250」、Methods in enzymology の Vol. 11(1967) p. 199-255、315-317、541-548に記載されている方法を用いることができる。一例として、還元カルボキシメチル化によるカルボキシメチル化牛血清アルブミン作製の代表的な方法を示す。まず、牛血清アルブミンを 7 M グアニジン塩酸塩および 10 mM EDTA を含む 0.5 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、pH を 8.3 以上に調整する。窒素置換した後にジチオスレイトールを加え、アルブミンのジスルフィド結合を還元する。さらにヨード酢酸を加え、遮光下で反応させて S-アルキル化をおこなった後、透析あるいはゲル濾過により脱塩し、目的物を得ることができる。ヨード酢酸の代わりに他の S-アルキル化剤を用いることによって、それぞれの誘導体を得ることができる。また、過ギ酸酸化法および亜硫酸分解法については、前記の「新生化学実験講座 1、タンパク質 II、一次構造」p. 76 に記載されている方法を用いることができる。

本発明の薄膜は支持体上に形成されるが、平面支持体上に形成されるか、あるいは 96 穴プレートの様な容器の底面を支持体として形成されることが好ましい。支持体の材質や形状は特に限定されないが、薄膜上の表面変化を顕微鏡下で観察するような場合や、吸光度測定や蛍光測定などの分光学的手段により表面変化を検出する場合には、例えば、薄膜は透明又は半透明の支持体上に形成されることが好ましい。このような透明又は半透明の高分子支持体としては、例えば、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、アタクティックポリスチレン、シンジオタクティックポリスチレン、ポリカーボネート、トリアセチルセ

ルロース、ポリメチルメタクリレート、ポリスルフォン、ポリアリレート、ポリエチレン等からなる透明又は半透明プラスチックフィルムなどを用いることができる。また、このようなプラスチックをラミネートした紙を用いることもできる。特に好ましいのはポリエチレンテレフタレート、シンジオタクティックポリスチレン、ポリアリレートであり、ポリエチレンテレフタレートが最も好ましい。また、用いる支持体に着色が施されていてもよい。

支持体の厚さも特に限定されないが、フィルム状の平面支持体を用いる場合、 $50\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ が好ましく、より好ましくは $100\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ である。特に好ましくは $175\mu\text{m}$ 程度のものを用いることができる。該支持体上の薄膜は単層又は重層で形成することができるが、薄膜はできる限り均一な表面を与えるように調製すべきである。例えば、乾燥後の膜厚が $0.5\sim 10\mu\text{m}$ 、好ましくは $0.5\sim 7\mu\text{m}$ 程度になるように調製することが好ましい。

薄膜の調製には、例えば、トランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれるプロテアーゼ基質を含む水溶液に、必要に応じてプロテアーゼ・インヒビターと必要に応じて硬膜剤の所定量を加え、さらに必要に応じて色素溶液又は色素分散物を加えて均一に混合し、得られた溶液あるいは分散液を支持体表面に塗布して乾燥すればよい。また、必要に応じて、上記の溶液又は分散液に他のプロテアーゼ基質、例えば、例えばコラーゲン、ゼラチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチン、カゼインを添加してもよい。塗布方法としては、例えば、ディップ塗布法、ローラー塗布法、カーテン塗布法、押し出し塗布法などを採用することができる。もともと、薄膜の調製方法はこれらに限定されることはなく、例えば、写真用フィルムの技術分野などにおいて汎用されている薄膜形成方法などを適宜採用することが可能である。

薄膜を支持体上に形成するにあたり、薄膜と支持体との接着を改善するために、薄膜と支持体表面との間に下塗り層を設けてもよい。例えば、塩化ビニル、塩化ビニリデン、ブタジエン、スチレン、メタクリル酸、アクリル酸、イタコン酸、無水マレイン酸等から選ばれるモノマーの1種又は2種以上を重合させて得られ

る重合体又は共重合体、ポリエチレンイミン、エポキシ樹脂、グラフト化ゼラチン、又はニトロセルロースなどの重合体を下塗り層として形成することができる。また、ポリエステル系支持体を用いる場合には、下塗り層に替えて、支持体表面をコロナ処理、紫外線処理、又はグロー処理することによっても、支持体と薄膜との接着力を改善できる場合がある。コロナ処理、紫外線処理、又はグロー処理を行った後下塗り層を塗布する方法も支持体と薄膜との接着力を改善できる。

本明細書において用いられる「支持体上に形成した薄膜」という用語またはその同義語については、1又は2以上の下塗り層及び／又は支持体表面の処理を排除するものと解釈してはならない。もっとも、薄膜と支持体との接着を改善するための手段は上記のものに限定されることはなく、例えば、写真用フィルムの技術分野などにおいて汎用されている手段を適宜採用することができる。また、薄膜が複数の層を重層してなる場合には、重層される2つの層の間にさらに中間層を設けてもよく、本明細書において用いられる「重層」という用語は、2つの層が直接接触している場合に限定して解釈してはならない。このような中間層を適宜配置する手段は、例えば、写真用フィルムの技術分野などにおいて汎用されている。また、支持体表面上に形成された膜の表面に保護層を設けることも好ましく、その技術は写真用フィルムの技術分野などにおいて汎用されている。

薄膜中にはトランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれるプロテアーゼ基質、及び必要に応じて硬膜剤のほか、さらに必要に応じて色素及び／又はプロテアーゼ・インヒビターを配合できるが、その他の各種の添加物を加えてもよい。添加物としては、例えば薄膜の塗布を容易にするための界面活性剤、膜質を改善するための可塑剤（例えばグリセリン等）、色素を分散するためのオイル又は乳化剤、防腐剤、防かび剤、pHを調節するための酸または塩基、酵素活性を調節するための Ca^{++} 等の無機イオンがあげられるが、これらに限定されることはない。また、本発明の薄膜には帯電防止の手段が施されていてもよい。例えば、プロテアーゼ基質配合層の側又はその反対側の表面電気抵抗が $10^{12}\Omega$ 以下であるものを好ましく用いることができる。膜の表面電気抵抗を低下

させるための手段としては、例えば特願 2000-24011 号明細書に記載されている方法を用いることができ、あるいは写真用フィルムに利用されている技術を採用することができる。

例えば、本発明の薄膜の製造には、以下に示すような添加剤を必要に応じて使用することができる。硬膜剤（リサーチ・ディスクロージャー（RD）17643：26 頁；RD18716：651 頁左欄；RD307105：874～875 頁）、バインダー（RD17643：26 頁；RD18716：651 頁左欄；RD307105：873～874 頁）、可塑剤又は潤滑剤（RD17643：27 頁；RD18716：650 頁右欄；RD307105：876 頁）、塗布助剤又は界面活性剤（RD17643：26～27 頁；RD18716：650 頁右欄；RD307105：875～876 頁）、帯電防止剤（RD17643：27 頁；RD18716：650 頁右欄；RD307105：876～877 頁）、マット剤（RD307105：878～879 頁）。これらの添加剤はいずれも写真用フィルムの技術分野において汎用されており、本発明の薄膜の製造に同様に利用できる。

本発明の薄膜の製造には、必要に応じて有機又は無機の硬膜剤を用いることができる。このような硬膜剤は、例えばゼラチンなどの硬化促進のために利用可能な硬膜剤から適宜選択すればよいが、測定の対象となるプロテアーゼの活性に影響を与えないものを選択する必要がある。例えば、活性ハロゲン化合物（2，4-ジクロロ-6-ヒドロキシ-1，3，5-トリアジン及びそのナトリウム塩など）及び活性ビニル化合物（1，3-ビスビニルスルホニル-2-プロパノール、1，2-ビス（ビニルスルホニルアセトアミド）エタン、ビス（ビニルスルホニルメチル）エーテル、及びビニルスルホニル基を側鎖に有するビニル系ポリマーなど）を用いることができ、1，2-ビス（ビニルスルホニルアセトアミド）エタンを用いることが好ましい。

本発明に用いられるプロテアーゼ・インヒビターは、マトリックスメタロプロテアーゼを阻害することが知られている各種のキレート剤、特に EDTA あるいはオ-フェナントロリンを用いることができる。またマトリックスプロテアーゼ特異的な阻害剤としてティッシューインヒビターオブメタロプロテアーゼ（TIMP）類や、Batimastat, Marimastat, CGS27023A 等の阻害剤を用いることができ、これ

らについては、例えば細胞工学 1998 年、第 17 巻、p. 561 に記載されている。また、セリンプロテアーゼ阻害剤としてはフェニルメタンスルホニルフルオリド、プラスミノーゲンアクティベーターインヒビター 1、メシル酸ガベキサート、アプロチニン、ロイペプチン等の阻害剤を用いることができ、これらの一部については例えばプロテアーゼと生体機能（現代化学増刊 2 2）P. 224, 1993 に記載されているがこれらの化合物に限定されることはない。

本発明の薄膜に色素を配合した場合には、薄膜を水洗することによりプロテアーゼの作用により薄膜に形成された消化痕を検出することが可能になる。色素としては可視域に吸収を有するものであれば特に制限はなく、公知の物質を含む種々の色素を使用することができる。色素として、蛍光色素又は蛍光色素以外の色素のいずれを用いてもよいが、高分子支持体を用いる場合には、蛍光色素以外の色素を用いることが好ましい。1 種類の色素を用いてもよいが、2 種以上の色素を組み合わせ用いてもよい。色素としては染料又は顔料のいずれを用いてもよく、両者を組み合わせ用いてもよい。例えば、重層した薄膜を用いる場合には、各層に異なる色の色素を配合することができる。

薄膜中への色素の添加量は特に限定されないが、薄膜の面積に対する色素合計量として $0.001 \sim 10 \text{ mmol/m}^2$ 、好ましくは $0.01 \sim 1 \text{ mmol/m}^2$ である。薄膜の製造に好適に利用可能な色素の種類および膜への添加方法については、特願平 11-365074 号明細書に記載されている。また蛍光色素を用いる場合は、フルオレセインやローダミンなどの蛍光色素のほか、可視域あるいは近赤外域に蛍光を発する蛍光色素などを用いることができるが、その種類に特に制限はない。また、トランスフェリン誘導体又はアルブミン誘導体と反応して結合する性質を持つ色素あるいは蛍光色素を用いることもできる。例えば active orange GT、フルオレセインイソチオシアネートなどが代表的であるがこれらに限定されることはない。

染料としては、例えば、アゾ染料、アゾメチン染料、インドアニリン染料、ベンゾキノロン染料、ナフトキノロン染料、アントラキノロン染料、ジフェニルメタン染料、トリフェニルメタン染料、キサントゲン染料、アクリジン染料、アジン染料、

オキサジン染料、チアジン染料、オキソノール染料、メロシアニン染料、シアニン染料、アリーリデン染料、スチリル染料、フタロシアニン染料、ペリノン染料、インジゴ染料、チオインジゴ染料、キノリン染料、ニトロ染料、ニトロソ染料などを挙げることができる。具体的な化合物については「新版染料便覧」（有機合成化学協会編；丸善，1970）、「カラーインデックス」（The Society of Dyers and colourists）、「色材工学ハンドブック」（色材協会編；朝倉書店，1989）などに記載されている。薄膜の製造には水溶性の染料を用いることもできるが、油溶性の染料は酵素反応に対して悪影響を及ぼさない点で好適である。薄膜に配合可能な好ましい染料の具体例は特願平11-365074号明細書に記載されているが、それらの色素に限定されることはない。

本発明に用いられる顔料の種類は特に限定されず、有機又は無機のいずれの顔料を用いてもよい。また、顔料としては、市販のもの他、各種文献に記載されている公知のものや新規化合物を利用できる。具体的には、有機顔料としては、例えば、アゾ顔料（アゾレーキ顔料、不溶性モノアゾ顔料、不溶性ジスアゾ顔料、縮合アゾ顔料、金属錯塩アゾ顔料、キレートアゾ顔料）、多環式顔料（フタロシアニン系顔料、アントラキノン系顔料、ペリレン及びペリノン系顔料、インジゴ系顔料、チオインジゴ系顔料、キナクリドン系顔料、ジオキサジン系顔料、イソインドリノン系顔料、キノフタロン系顔料、ジケトピロロピロール系顔料等）、染付けレーキ顔料（酸性または塩基性染料のレーキ顔料）、アジン顔料等、その他の顔料（ニトロソ顔料、アリザリンレーキ顔料、アルカリブルー）などを挙げることができ、無機顔料としては群青、コバルトブルーなどを挙げることができる。

これらのうち、油溶性の顔料は酵素反応に対して悪影響を及ぼさない点で好適である。また、好ましい青味の色調を得るためには、フタロシアニン顔料、アントラキノン系のインダントロン顔料、染め付けレーキ顔料系のトリアリールカルボニウム顔料、インジゴ、無機顔料の群青、コバルトブルーなどが好ましい。さらに色調を調整するために、赤ないし紫色の顔料、例えば、ジオキサジン系顔料、

キナクリドン系顔料、ジケトピロロピロール系顔料を上記青色顔料と併用してもよい。顔料に関しては、カラーインデックス(The Society of Dyers and Colourists 編)、「改訂新版顔料便覧」日本顔料技術協会編(1989年刊)、「最新顔料応用技術」CMC出版(1986年刊)、「印刷インキ技術」CMC出版(1984年刊)、W. Herbst, K. Hunger 共著による Industrial Organic Pigments (VCH Verlagsgesellschaft、1993年刊) 等がある。

青色顔料の例としては、好ましくは、フタロシアニン系の C. I. Pigment Blue 15、同 15:1、同 15:2、同 15:3、同 15:4、同 15:6 (銅フタロシアニン)、モノクロロないし低塩素化銅フタロシアニン、C. I. Pigment Blue 16 (無金属フタロシアニン)、中心金属が Zn、Al、Ti であるフタロシアニン、バット染料としても知られるインダントロン系の C. I. Pigment blue 60 やそれらのハロゲン置換体、例えば C. I. Pigment Blue 64、同 21、アゾ系の C. I. Pigment Blue 25、インジゴ系の C. I. Pigment Blue 66 及びレーキ顔料である C. I. Pigment Blue 63、トリアリールカルボニウム型酸性染料あるいは塩基性染料のレーキ顔料である C. I. Pigment Blue 1、同 2、同 3、同 9、同 10、同 14、同 18、同 19、同 24:1、同 24:x、同 56、同 61、同 62 などが挙げられる。

赤ないし紫顔料としては、好ましくは、ジオキサジン系の C. I. Pigment Violet 23、同 37、アゾ系の C. I. Pigment Violet 同 13、同 25、同 32、同 44、同 50、C. I. Pigment Red 23、同 52:1、同 57:1、同 63:2、同 146、同 150、同 151、同 175、同 176、同 185、同 187、同 245、キナクリドン系の C. I. Pigment Violet 19、同 42、C. I. Pigment Red 122、同 192、同 202、同 207、同 209、トリアリールカルボニウム系のレーキ顔料である C. I. Pigment Violet 1、同 2、同 3、同 27、同 39、C. I. Pigment Red 81:1、ペリレン系の C. I. Pigment Violet 29、アントラキノンの C. I. Pigment Violet 5:1、同 31、同 33、チオインジゴ系の C. I. Pigment Red 38、同 88 などが挙げられる。

薄膜の製造には、上述の顔料それ自体を用いてもよいが、表面処理を施された顔料を用いてもよい。表面処理の方法には、例えば、樹脂やワックスを表面コー

トする方法、界面活性剤を付着させる方法、反応性物質（例えば、シランカップリング剤やエポキシ化合物、ポリイソシアネートなど）を顔料表面に結合させる方法などを挙げることができ、その具体的手段は「金属石鹸の性質と応用」（幸書房）、「印刷インキ技術」（CMC出版、1984）、「最新顔料応用技術」（CMC出版、1986）などに記載されている。

薄膜の製造にあたり、一般的には、顔料をプロテアーゼ基質中に分散させることが望ましく、その目的のために分散剤を用いることができる。分散剤の種類は特に限定されず、用いるプロテアーゼ基質と顔料との組み合わせに応じて種々のもの、例えば界面活性剤型の低分子分散剤や高分子型分散剤などを用いることができる。疎水性のプロテアーゼ基質中で用いる場合には、分散安定性の観点から高分子型分散剤を用いることが好ましい。分散剤の例としては、特開平3-69949号公報、欧州特許公開549486号公報等に記載のものを挙げることができる。

薄膜の製造に使用される顔料の粒径は、例えば、分散後に0.01~10 μm の範囲であることが好ましく、0.05~1 μm であることがさらに好ましい。顔料をプロテアーゼ基質中に分散する方法としては、インク製造やトナー製造時に用いられる公知の分散技術を利用できる。分散機としては、例えば、サンドミル、アトライター、パールミル、スーパーミル、ボールミル、インペラー、デスペーサー、KDミル、コロイドミル、ダイナトロノ、3本ロールミル、加圧ニーダー等を挙げることができ、その手法の詳細は「最新顔料応用技術」（CMC出版、1986）に記載されている。

薄膜には、染料を固体微粒子分散物として添加することができる。染料の固体微粒子分散物は、所望により適当な溶媒（水、アルコールなど）を用い、ボールミル、振動ボールミル、遊星ボールミル、サンドミル、コロイドミル、ジェットミル、ローラーミル等の分散機を用いて調製することができるが、縦型あるいは横型の媒体分散機を用いることが好ましい。また、染料を適当な溶媒中に溶解させたのち貧溶媒に添加して微結晶を析出させる方法や、pHをコントロールする

ことによってまず染料を溶解させ、その後pHを変化させて微結晶を析出させる方法などを利用して分散物を得ることができる。いずれの場合も分散剤を用いることが好ましい。

染料の固体微粒子分散物を含有する薄膜は、上記のようにして得た染料の固体微粒子を適当なプロテアーゼ基質中に分散させることによってほぼ均一な固体微粒子分散物を調製した後、これを所望の支持体上に塗設することによって形成することができる。また、解離状態の染料を塩の形で水溶液として塗布した後、酸性のゼラチンを上塗りすることにより、析出分散を塗布時に得る方法を採用してもよい。分散剤としては、例えば、公知のアニオン性、カチオン性、ノニオン性、又は両性の低分子又は高分子分散剤を用いることができる。例えば、特開昭52-92716号公報、国際公開WO88/04794号、特開平10-20496号公報に記載の分散剤を挙げることができる。特にアニオン性及び／又はノニオン性の高分子分散剤の使用が好ましい。

薄膜に含まれる色素は、特開昭62-215272号公報（125頁右上欄2行目～127頁左下欄末行）、特開平2-33144号公報（37頁右下欄14行目～38頁左上欄11行目）、欧州特許公開EP0.355.600A2号（85頁22行目～31行目）に記載の紫外線吸収剤、特開平07-104448号公報（第70欄10行目～第71欄2行目）記載の退色防止剤と併用することもできる。

また、薄膜への色素の導入は、例えば、特開平07-104448号公報（第71欄3行目～第72欄11行目）などに記載の種々の公知分散方法により行うことができるが、高沸点有機溶媒（必要に応じて低沸点有機溶媒を併用してもよい）に溶解し、ゼラチンなどのプロテアーゼ基質水溶液に乳化分散する水中油滴分散法を採用してもよい。水中油滴分散法に用いられる高沸点溶媒の例は米国特許第2,322,027号明細書などに記載されている。また、ポリマー分散法の1つとしてのラテックス分散法及びラテックスの具体例は、米国特許第4,199,363号明細書、西独特許出願第(OLS)2,541,274号明細書、

同2, 541, 230号明細書、特公昭53-41091号公報、及び欧州特許公開第029104号公報等に記載されており、これらを薄膜製造に利用してもよい。また、有機溶媒可溶性ポリマーによる分散法について国際公開WO88/00723号公報に記載されている。

水中油滴分散法に用いることのできる高沸点有機溶媒としては、例えば、フタル酸エステル類（例えば、ジブチルフタレート、ジオクチルフタレート、ジシクロヘキシルフタレート、ジ-2-エチルヘキシルフタレート、デシルフタレート、ビス（2, 4-ジ-tert-アミルフェニル）イソフタレート、ビス（1, 1-ジエチルプロピル）フタレート）、リン酸又はホスホンのエステル類（例えば、ジフェニルホスフェート、トリフェニルホスフェート、トリクレジルホスフェート、2-エチルヘキシルジフェニルホスフェート、ジオクチルブチルホスフェート、トリシクロヘキシルホスフェート、トリ-2-エチルヘキシルホスフェート、トリドデシルホスフェート、ジ-2-エチルヘキシルフェニルホスフェート）、安息香酸エステル酸（例えば、2-エチルヘキシルベンゾエート、2, 4-ジクロロベンゾエート、ドデシルベンゾエート、2-エチルヘキシル-p-ヒドロキシベンゾエート）、アミド類（例えば、N, N-ジエチルドデカンアミド、N, N-ジエチルラウリルアミド）、アルコール類またはフェノール類（イソステアリルアルコール、2, 4-ジ-tert-アミルフェノールなど）、脂肪族エステル類（例えば、コハク酸ジブトキシエチル、コハク酸ジ-2-エチルヘキシル、テトラデカン酸2-ヘキシルデシル、クエン酸トリブチル、ジエチルアゼレート、イソステアリルラクテート、トリオクチルシトレート）、アニリン誘導体（N, N-ジブチル-2-ブトキシ-5-tert-オクチルアニリンなど）、塩素化パラフィン類（塩素含有量10%~80%のパラフィン類）、トリメシン酸エステル類（例えば、トリメシン酸トリブチル）、ドデシルベンゼン、ジイソプロピルナフタレン、フェノール類（例えば、2, 4-ジ-tert-アミルフェノール、4-ドデシルオキシフェノール、4-ドデシルオキシカルボニルフェノール、4-（4-ドデシルオキシフェニルスルホニル）フェノール）、カルボ

ン酸類（例えば、2-（2, 4-ジ-*tert*-アミルフェノキシ）酪酸、2-エトキシオクタンデカン酸）、アルキルリン酸類（例えば、ジ-2（エチルヘキシル）リン酸、ジフェニルリン酸）などが挙げられる。また、補助溶媒として沸点が30℃以上約160℃以下の有機溶剤（例えば、酢酸エチル、酢酸ブチル、プロピオン酸エチル、メチルエチルケトン、シクロヘキサノン、2-エトキシエチルアセテート、ジメチルホルムアミド）を併用してもよい。

高沸点有機溶媒の量は用いられる色素1gに対して10g以下、好ましくは5g以下、より好ましくは1g～0.1gである。また、プロテアーゼ基質1gに対して1ml以下、好ましくは0.5ml以下、さらに好ましくは0.3ml以下が適当である。疎水性の色素を親水性コロイドに分散する際には、種々の界面活性剤を用いることができる。例えば、特開昭59-157636号公報の第37～38頁、リサーチ・ディスグロッジャー（以下、RDと略す）17643に界面活性剤として挙げられたものを使うことができる。

プロテアーゼ活性測定に用いる試料として好ましくは生体試料を用いることができる。生体試料としては、ヒトを含む哺乳類動物から分離・採取された生体試料を用いることができ、例えば、罹患した哺乳類動物、疾患の存在が疑われる哺乳動物、又は実験動物などから分離・採取した生体試料を用いることができる。生体試料の形態は特に限定されないが、組織切片などの固形試料や体液などの非固形試料を用いることができる。非固形試料としては、例えば、組織から吸引により採取した細胞又は組織片を含む試料、血液、リンパ液、唾液などの体液を用いることができる。例えば、肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、肝臓癌、口腔癌、前立腺癌、腎臓癌、膀胱癌などの癌組織から手術や組織検査などにより分離・採取した癌組織、リンパ節、歯周病組織、リウマチ性関節炎の滑膜や骨組織などの組織から手術や組織検査などにより分離・採取した組織、歯肉溝滲出液、破壊性病変組織に含まれる液（例えばリウマチ性病変の関節液又は歯槽膿漏組織抽出液）、胸水、腹水、脳脊髄液、乳腺異常分泌液、卵巣嚢胞液、腎臓嚢胞液、喀痰、血液あるいは血球などを用いることができる。

試料が組織の場合には、例えば、液体窒素で急速凍結した試料から凍結切片作成装置を用いて厚さ1～10 μm 、好ましくは4～6 μm の切片を調製し、この切片を薄膜に貼付することによって試料と薄膜とを接触させることができる。穿刺吸引により採取した細胞又は組織片を含む非固形試料についても、コンパウンドなどの成形材料と混合して液体窒素で急速凍結し、同様に切片を作製して用いることができる。また、組織から穿刺吸引により採取した細胞又は組織片を含む非固形試料をそのまま用いる場合には、吸引した試料を薄膜上に吐出させ、細胞を分散状態で薄膜に接着させればよい。組織から穿刺吸引により採取した細胞をサイトスピン装置を用いて薄膜に接着させることもできる。さらに、生体試料が組織片の場合は、採取した組織の水分を軽く拭いた後、プロテアーゼ基質を含む薄膜の上に1分から30分程度静置することで試料と薄膜とを接触させることができる。

また、リウマチ性関節炎の患者から採取した滑膜液の様な非固形試料を用いる場合には、試料を適当な濃度に希釈し、及び／又は必要な前処理を行った後に、約1～50 μL 、好ましくは1～20 μL 程度を薄膜上に滴下すればよい。歯周病の歯肉溝滲出液を試料として用いる場合には、歯肉溝内に濾紙を挿入して約5～10 μL 程度の歯肉溝滲出液を採取し、該濾紙を薄膜に貼付する方法を採用することができる。歯肉溝滲出液の採取後、必要に応じて蒸留水や適宜の緩衝液（例えば、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl_2 , 0.2 M NaCl など）を用いて濾紙から歯肉溝滲出液を抽出し、抽出液を薄膜上に滴下してもよい。より多量に採取できる体液試料（囊胞液など）の場合には、試料を入れた容器の中に薄膜の一部を浸漬する方法により再現性のよい結果が得られる。

プロテアーゼを含む組織切片を薄膜に貼付するか、あるいは液体試料を滴下するなどの手段によって薄膜とプロテアーゼを含む試料を接触させた後、プロテアーゼ活性の発現に適した温度、例えば室温から50℃の間の温度、さらに好ましくは37～47℃の飽和湿度条件下でトランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれるプロテアーゼ基質の消化に必要な時間、例えば10

分から 30 時間程度薄膜をインキュベートする。必要な時間は試料や薄膜の種類によって異なるが、好ましくは、組織切片又は吸引により得た細胞若しくは組織片を含む非固形試料については 37℃で 10 分間～48 時間、さらに好ましくは 10 分間～24 時間、滲出液などの液状の試料については 10 分間～24 時間、好ましくは 10 分間～6 時間インキュベートし、試料中のプロテアーゼによって薄膜中に消化痕を形成させる。

その後、薄膜を染色及び／又は洗浄し、消化されたプロテアーゼ基質、及び薄膜が色素を含む場合には消化物に含まれる色素を除去する。さらに、ヘマトキシリンやメチルグリーンにより薄膜上の生体試料に含まれる細胞核を染色する方法を追加すると、消化痕の部位を詳細に特定することができる。また、色素を含まない薄膜を用いる場合には、薄膜と試料とを接触させた後、薄膜を染色することにより消化痕の検出が容易になる。染色ために用いる色素としては、アミドブラック 10 B、ボンソー 3 R、Biebrich Scarlet の他、特願平 11-192130 号明細書に記載された各種の色素を用いることができる。

生体試料中の実質的に連続した 2 以上の切片のうちの一つをプロテアーゼ・インヒビターを含まない薄膜に貼付し、他の切片の 1 つをプロテアーゼ・インヒビターを含む薄膜に貼付して、両者の薄膜の消化痕を比較することにより、プロテアーゼの種類を特定することが可能になる。プロテアーゼ・インヒビターの種類は特に限定されないが、例えば、キレート剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、又はセリンプロテアーゼ阻害剤などを好適に用いることができる。

また、プロテアーゼ基質及び色素を含む単層の薄膜を用いる場合には、試料中のプロテアーゼにより薄膜が消化されるに従って薄膜の光学濃度が減少するが、プロテアーゼ基質を含む薄膜が重層塗布されており、各層に異なる色の色素が添加されている場合には、試料中のプロテアーゼにより薄膜が消化されるに従って、光学濃度とともに薄膜の色相が変化する。このような薄膜を用いると、消化の強さを視覚的に判定することが容易である。

本発明の薄膜を用いて生体試料に含まれるプロテアーゼ活性を測定し、試料が

由来した生体の状況、例えば癌の転移やリウマチの進行度などとの対応を調べることができる。消化痕における消化の強さの判定には、光学顕微鏡下で目視で判定する方法、共焦点光学顕微鏡により膜の三次元的な形態を観察する方法、分光器により消化痕の光学濃度を測定する方法、光学顕微鏡で得られる画像をデジタルカメラあるいはスキャナーによりコンピューターに取り込み、画像解析の方法により消化痕における各種の数値化を行う方法などのいずれを採用してもよい。画像解析を行う場合には種々のデータ処理法を用いることができ、その種類は特に限定されないが、消化痕の面積、あるいは消化痕部分の濃度と面積の積分を用いて消化の程度を数値化することが好ましい。

なお、プロテアーゼ基質を含む薄膜を用いたプロテアーゼ活性の測定方法に関する技術は、例えば、特開平 9-832035 号公報、特願平 11-174826 号明細書、特願平 11-192130 号明細書、特願平 11-365074 号明細書、及び特願 2000-24011 号明細書などに記載されているので、必要に応じてこれらの明細書を参照することにより、本発明を容易に実施できる場合がある。これらの明細書の開示を本明細書に参考として含める。また、特願 2000-83176 号明細書及び特願 2000-187061 号明細書の開示の全てを参照として本明細書の開示に含める。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。

例 1 : カルボキシメチルトランスフェリンの作製

牛血清トランスフェリン 10 g を 7M 塩酸グアニジンと 10 mM EDTA 2 ナトリウムを含む 0.5M トリス-塩酸バッファー (pH8.5) 3 リットルに溶解した。容器内を窒素ガスで置換した後、ジチオスレイトール (Dithiothreitol) 10 g を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、直射光の当たらないところで秤量したヨード酢酸 25 g を加え、遮光下で室温 30 分間反応させた。反応終了後、カットオフ分子量 7,000

の透析膜を用いて透析し、脱塩した。得られた反応物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、反応原料のトランスフェリンが分子量約 82,000 のバンドを示したのに対し、反応物は分子量が約 88,000 と増加した位置にバンドを示した。

例 2 : シアノエチルトランスフェリンの作製

牛血清トランスフェリン 10 g を 8M 尿素水溶液 2 リットルに溶解した。水酸化ナトリウムで pH を 8.0 に調整し、容器内を窒素ガスで置換した後、ジチオスレイトール 10 g を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、アクリロニトリル 6.9 g を加え、室温で 4 時間反応させた。反応終了後、カットオフ分子量 7,000 の透析膜を用いて透析し、脱塩した。得られた反応物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、反応原料のトランスフェリンより高分子量側にバンドを示した。

例 3 : エチルスクシンイミドトランスフェリンの作製

牛血清トランスフェリン 10 g を 8M 尿素水溶液 2 リットルに溶解した。水酸化ナトリウムで pH を 8.0 に調整し、容器内を窒素ガスで置換した後ジチオスレイトール 10 g を加えた。室温で 2 時間攪拌した後 N-エチルマレイミド 19 g を加えた。室温で 2 時間反応させた後、カットオフ分子量 7,000 の透析膜を用いて透析し、脱塩した。得られた反応物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、反応原料のトランスフェリンより高分子量側にバンドを示した。

例 4 : トランスフェリン誘導体の薄膜の作製

(支持体の作成)

175 μm の PET クリアーフィルムの表面をコロナ放電処理したのち、以下の組成の下塗りを施した支持体を作成した。なお、裏面の電気抵抗を測定したところ、 $1 \times 10^8 \Omega$ であった。

1. おもて面

ゼラチン 0.3 g/m²硬膜剤 (1) 0.001 g/m²

2. 裏面

ゼラチン 0.05 g/m²

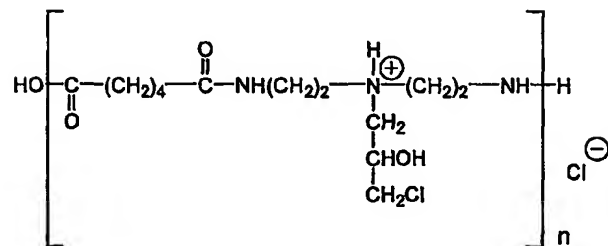
酸化アンチモンをドーブした

二酸化スズの水分散物 0.04 g/m²メチルセルロース 0.01 g/m²

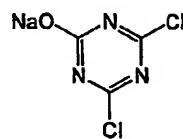
マツト剤

(平均粒径 3 μ の PMMA ポリマー粒子) 0.005 g/m²硬膜剤 (2) 0.002 g/m²

硬膜剤(1)



硬膜剤(2)



(塗布液の調製および塗布)

例1から3の操作により得られたトランスフェリン誘導体各 3 g をそれぞれ 100 mL の純水に溶解し、塩酸または NaOH により pH を 7.0 から 7.5 の間に調整した。硬膜剤として 1, 2-ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンを 45 mg ずつ添加した。前記支持体に各トランスフェリン誘導体を、膜厚約 3 μm になるよう塗布した。

例5：色素を含むトランスフェリン誘導体薄膜の作製

特願平 11-365074 号明細書の例 1 と同じ処方で、ただしゼラチンの代わりに上記トランスフェリン誘導体を用い、赤色色素を含むトランスフェリン誘導体の薄膜を作製した。

例 6：キレート剤を含むカルボキシメチルトランスフェリンの薄膜の作製

上記例 1 の操作により得られたカルボキシメチルトランスフェリン 3 g を 100 mL の純水に溶解し、塩酸または NaOH により pH を 7.0 から 7.5 の間に調整した。硬膜剤として 1, 2-ビス（ビニルスルホニルアセトアミド）エタンを 45 mg、およびキレート剤として o-フェナントロリンを 0.38 g 添加した。例 4 に示した支持体に各トランスフェリン誘導体を、膜厚約 3 μm になるよう塗布した。

例 7：色素とトリプシンインヒビターを含むカルボキシメチルトランスフェリン薄膜の作製

特願平 11-365074 号明細書の例 2 と同様の処方で、ただしゼラチンの代わりにカルボキシメチルトランスフェリンを用い、また、o-フェナントロリンの代わりにメシル酸ガベキサートを含むカルボキシメチルトランスフェリン 1 g あたり 0.05 g 添加し、赤色色素とトリプシンインヒビターを含むカルボキシメチルトランスフェリンの薄膜を作製した。

例 8：ゼラチン薄膜の作製（比較例）

豚皮酸処理ゼラチン 10 g を純水 127 g に溶解し、硬膜剤として 1, 2-ビス（ビニルスルホニルアセトアミド）エタンを 150 mg 添加した。例 4 に示した支持体に膜厚約 3 μm になるよう塗布した。

例 9：トランスフェリン薄膜とゼラチン薄膜のプロテアーゼ溶液による消化
（プロテアーゼ溶液）

MMP-2（ヤガイ製、2 u/mL）、MMP-3（ヤガイ製、0.5 u/mL）、MMP-7（ヤガイ製、

1 u/mL) を PBS により 3 倍希釈し、MMP-9 (ヤガイ製、5 u/mL)、牛トリプシン (シグマ製) を PBS により 1u/mL に調製した。

(染色液の作製)

Biebrich Scarlet (Aldrich 製) 0.45 g を蒸留水 75 ml に添加し、さらにトリクロロ酢酸 5 g および 100%エタノール 75 ml を添加した。スターラーで攪拌して溶解させ、濾紙で濾過し不溶解分を除いた上で染色液とした。

(膜の酵素消化実験)

例 4 に従って得られたトランスフェリン誘導体の薄膜と、例 8 に従って得られたゼラチン薄膜に上記酵素溶液を 1 μ l ずつ並べて滴下し、湿箱中で 37℃、16 時間インキュベートした。その後 Biebrich Scarlet 染色液に膜を 4 分間浸漬し、10 分間水洗した。

結果を目視で評価したところ、ゼラチン膜はすべての酵素によって消化されており、溶液を滴下した部分に穴が開いていた。これに対して、カルボキシメチルトランスフェリン、シアノエチルトランスフェリン、エチルスクシンイミドトランスフェリンは MMP-2, MMP-3, MMP-9 による消化をほとんど受けておらず、MMP-7 によってはゼラチンと同様に消化された。これらの膜はトリプシンによってはやはり消化されたが、ゼラチン膜よりかなり消化は弱かった。この結果から、トランスフェリン誘導体の薄膜は MMP-7 に対する選択性が高まったと結論できた。

また、同様の酵素消化実験を、例 6 に示すキレート剤を含むカルボキシメチルトランスフェリンの薄膜に対して行ったところ、MMP 類による消化は起らず、トリプシンによってのみ消化された。さらに、例 7 に示す赤色色素とトリプシンインヒビターを含むカルボキシメチルトランスフェリンの薄膜に酵素溶液を滴下して湿箱中で 37℃、16 時間インキュベートし、水洗して観察すると、MMP-7 によってはっきりと消化された以外、MMP-2、MMP-3、MMP-9 およびトリプシンによってほとんど消化されなかった。

例 10：食道癌凍結切片のプロテアーゼ活性の測定

外科手術により摘出し凍結した食道癌癌検体を急速凍結した後、凍結切片作製装置を用いて -25°C で厚さ $4\mu\text{m}$ に薄切し、例5に従って作製した赤色の色素乳化物を含む3種のトランスフェリン誘導体およびゼラチン薄膜に接着させた。これらの膜を 37°C 、相対湿度100%で8時間インキュベートし、自然乾燥させたのち、10分間水洗した。マイヤーのヘマトキシリン液に2分間浸漬して核染色を行い、10分間水洗後、20秒間エタノールに浸漬して脱水し自然乾燥させた。また、同様に核染色を行ない、10分間水洗した後、20%グリセリン水溶液に5分間浸漬して自然乾燥させた。乾燥後、組織切片を覆うようにカバーエイドフィルム（サクラ精機製）をキシレンを用いて貼り付け食道癌切片を封入した。このフィルムをプラスチック製のホルダーに保持し、光学顕微鏡を用いて観察するといずれの薄膜においても食道癌組織切片中、核の形態より癌細胞が存在すると考えられる部位に薄膜の消化が認められ、プロテアーゼ活性があることが明らかとなった。20%グリセリン水溶液に浸漬して自然乾燥させる工程のみを変更した場合にも同様の結果を与えた。

カルボキシメチルトランスフェリン薄膜とゼラチン薄膜の結果を比較すると、ゼラチン薄膜の方が広範囲に消化されていた。次に、摘出した検体の周辺の正常組織と思われる部分について同様に凍結切片を作製して試験したところ、ゼラチン薄膜では一部に消化が見られたのに対して、トランスフェリン誘導体の薄膜ではほとんど消化が見られなかった。トランスフェリン誘導体の薄膜は、癌に対する選択性が高まったと考えられ、その原因は、例9の結果からトランスフェリン薄膜はMMP-7に対して選択性が高まっているためと考えられた。また、3種のトランスフェリン誘導体の薄膜の比較では、カルボキシメチルトランスフェリン薄膜が、消化部分と消化されない部分のコントラストが最も良く、最適であった。

例 11：カルボキシメチル化牛血清アルブミンの作製

牛血清アルブミン 10 g を 7M 塩酸グアニジンと 10 mM EDTA 2 ナトリウムを含む 0.5M トリス-塩酸バッファー (pH8.5) 3 リットルに溶解した。容器内を窒素ガスで置換した後、ジチオスレイトール(Dithiothreitol) 10 g を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、直射光の当たらないところで秤量したヨード酢酸 25 g を加え、遮光下で室温 30 分間反応させた。反応終了後、カットオフ分子量 7,000 の透析膜を用いて透析し、脱塩した。得られた反応物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、反応原料の牛血清アルブミンが分子量約 75,000 のバンドを示したのに対し、反応物は分子量が約 80,000 と増加した位置にバンドを示した。

例 12 : カルボキシメチル化コンアルブミンの作製

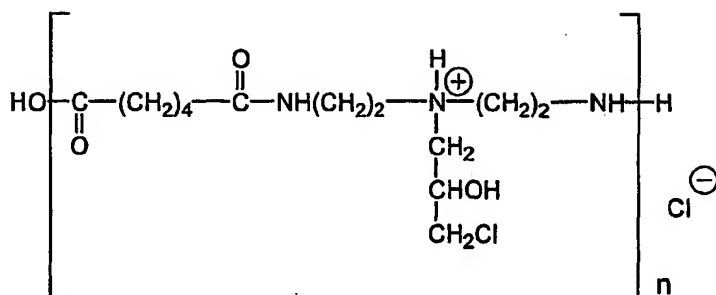
コンアルブミン 10 g を 7M 尿素と 10 mM EDTA 2 ナトリウムを含む 0.5M トリス-塩酸バッファー (pH8.5) 3 リットルに溶解した。容器内を窒素ガスで置換した後、ジチオスレイトール(Dithiothreitol) 10 g を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、直射光の当たらないところで秤量したヨード酢酸 25 g を加え、遮光下で室温 30 分間反応させた。反応終了後、カットオフ分子量 7,000 の透析膜を用いて透析し、脱塩した。得られた反応物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、反応原料のコンアルブミンが分子量約 82,000 のバンドを示したのに対し、反応物は分子量が約 87,000 と増加した位置にバンドを示した。

例 13 : シアノエチル牛血清アルブミンの作製

牛血清アルブミン 10 g を 8M 尿素水溶液 2 リットルに溶解した。水酸化ナトリウムで pH を 8.0 に調整し、容器内を窒素ガスで置換した後、ジチオスレイトール 10 g を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、アクリロニトリル 6.9 g を加え、室温で 4 時間反応させた。反応終了後、カットオフ分子量 7,000 の透析膜を用いて透析し、脱塩した。得られた反応物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、反応原料の牛血清アルブミンより高分子量側にバンドを示した。

牛血清アルブミン 10 g を 8M 尿素水溶液 2 リットルに溶解した。pH を 6.5 に調整し、容器内を窒素ガスで置換した後ジチオスレイトール 10 g を加えた。室温で 2 時間攪拌した後 N-エチルマレイミド 19 g を加えた。室温で 4 時間反応させた後、カットオフ分子量 7,000 の透析膜を用いて透析し、脱塩した。得られた反応物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、反応原料の牛血清アルブミンより高分子量側にバンドを示した。

硬膜剤(1)



硬膜剤(2)



(塗布液の調製および塗布)

例 1 1 から 1 3 の操作により得られたアルブミン誘導体各 3 g をそれぞれ 100 mL の純水に溶解し、塩酸または NaOH により pH を 7.0 から 7.5 の間に調整した。硬膜剤として 1, 2-ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンを 45 mg ずつ添加した。前記支持体に各アルブミン誘導体を、膜厚約 3 μm になるよう塗布した。

例 1 6 : 色素を含むアルブミン誘導体薄膜の作製

特願平 11-365074 号明細書の例 1 と同じ処方で、ただしゼラチンの代わりに上記アルブミン誘導体を用い、赤色色素を含むアルブミン誘導体の薄膜を作製した。薄膜を乾燥後 2 週間室温で保管したのち、100 mM 塩化カルシウム水溶液に 10 分間浸漬し、自然乾燥した。

例 1 7 : キレート剤を含むカルボキシメチル化牛血清アルブミンの薄膜の作製

上記例 1 1 の操作により得られたカルボキシメチル化牛血清アルブミン 3 g を 100 mL の純水に溶解し、塩酸または NaOH により pH を 7.0 から 7.5 の間に調整した。硬膜剤として 1, 2-ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンを 45 mg、およびキレート剤として o-フェナントロリンを 0.38 g 添加した。例 1 5 に示した支持体に各アルブミン誘導体を、膜厚約 3 μm になるよう塗布した。

例 18 : 色素とトリプシンインヒビターを含むカルボキシメチル化牛血清アルブミン薄膜の作製

特願平 11-365074 号明細書の例 2 と同様の処方で、ただしゼラチンの代わりにカルボキシメチル化牛血清アルブミンを用い、また、*o*-フェナントロリンの代わりにメシル酸ガベキサートを含むカルボキシメチル化牛血清アルブミン 1 g あたり 0.05 g 添加し、赤色色素とトリプシンインヒビターを含むカルボキシメチル化牛血清アルブミンの薄膜を作製した。

例 19 : ゼラチン薄膜の作製 (比較例)

豚皮酸処理ゼラチン 10 g を純水 127 g に溶解し、硬膜剤として 1, 2-ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンを 150 mg 添加した。例 15 に示した支持体に膜厚約 3 μ m になるよう塗布した。

例 20 : 牛血清アルブミン誘導体薄膜とゼラチン薄膜のプロテアーゼ溶液による消化

(プロテアーゼ溶液)

MMP-2 (ヤガイ製、2 u/mL)、MMP-3 (ヤガイ製、0.5 u/mL)、MMP-7 (ヤガイ製、1 u/mL) を PBS により 3 倍希釈し、MMP-9 (ヤガイ製、5 u/mL)、牛トリプシン (シグマ製) を PBS により 1u/mL に調製した。

(染色液の作製)

Biebrich Scarlet (Aldrich 製) 0.45 g を蒸留水 75 ml に添加し、さらにトリクロロ酢酸 5 g および 100%エタノール 75 ml を添加した。スターラーで攪拌して溶解させ、濾紙で濾過し不溶解分を除いた上で染色液とした。

(膜の酵素消化実験)

例 15 に従って得られたアルブミン誘導体の薄膜と、例 19 に従って得られたゼラチン薄膜に上記酵素溶液を 1 μ l ずつ並べて滴下し、湿箱中で 37℃、16 時間

インキュベートした。その後 Biebrich Scarlet 染色液に膜を 4 分間浸漬し、10 分間水洗した。

結果を目視で評価したところ、ゼラチン膜はすべての酵素によって消化されており、溶液を滴下した部分に穴が開いていた。これに対して、カルボキシメチル化牛血清アルブミン、シアノエチル化牛血清アルブミン、N-エチルスクシンイミド化牛血清アルブミンは MMP-2, MMP-3, MMP-9 による消化をほとんど受けておらず、MMP-7 によってはゼラチンと同様に消化された。これらの膜はトリプシンによってはやはり消化されたが、ゼラチン膜よりかなり消化は弱かった。この結果から、アルブミン誘導体の薄膜は MMP-7 に対する選択性が高まったと結論できた。

また、同様の酵素消化実験を、例 17 に示すキレート剤を含むカルボキシメチル化牛血清アルブミンの薄膜に対して行ったところ、MMP 類による消化は起らず、トリプシンによってのみ消化された。さらに、例 18 に示す赤色素とトリプシンインヒビターを含むカルボキシメチル化牛血清アルブミンの薄膜に酵素溶液を滴下して湿箱中で 37℃、16 時間インキュベートし、水洗して観察すると、MMP-7 によってはっきりと消化された以外、MMP-2、MMP-3、MMP-9 およびトリプシンによってはほとんど消化されなかった。

例 21：食道癌凍結切片のプロテアーゼ活性の測定

外科手術により摘出し凍結した食道癌癌検体を急速凍結した後、凍結切片作製装置を用いて -25℃ で厚さ 4 μm に薄切し、例 16 に従って作製した赤色の色素乳化物を含む 3 種のアルブミン誘導体およびゼラチン薄膜に接着させた。これらの膜を 37℃、相対湿度 100% で 8 時間インキュベートし、自然乾燥させたのち、10 分間水洗した。マイヤーのヘマトキシリン液に 2 分間浸漬して核染色を行い、10 分間水洗後、20 秒間エタノールに浸漬して脱水し自然乾燥させた。乾燥後、組織切片を覆うようにカバーエイドフィルム（サクラ精機製）をキシレンを用いて貼り付け食道癌切片を封入した。このフィルムをプラスチック製のホルダーに保持

し、光学顕微鏡を用いて観察するといずれの薄膜においても食道癌組織切片中、核の形態より癌細胞が存在すると考えられる部位に薄膜の消化が認められ、プロテアーゼ活性が検出された。

カルボキシメチル化牛血清アルブミン薄膜とゼラチン薄膜の結果を比較すると、ゼラチン薄膜の方が広範囲に消化されていた。次に、摘出した検体の周辺の正常組織と思われる部分について同様に凍結切片を作製して試験したところ、ゼラチン薄膜では一部に消化が見られたのに対して、アルブミン誘導体の薄膜ではほとんど消化が見られなかった。アルブミン誘導体の薄膜は、癌に対する選択性が高まったと考えられ、その原因は、例20の結果からアルブミン薄膜はMMP-7に対して選択性が高まっているためと考えられた。

産業上の利用可能性

本発明の薄膜は、特定のプロテアーゼにより選択的に消化痕が形成されるので、特定のプロテアーゼ活性の測定に有用である。

請求の範囲

1. プロテアーゼ活性を測定するための薄膜であって、支持体表面に形成され、トランスフェリン誘導体及びアルブミン誘導体からなる群から選ばれる1又は2以上の物質を含有する架橋された及び／又は実質的に水に溶けない薄膜。
2. さらにプロテアーゼ・インヒビターを含む請求の範囲第1項に記載の薄膜。
3. さらに1又は2以上の色素を含む請求の範囲第1項又は第2項に記載の薄膜。
4. 固体分散又は乳化分散された色素を含む請求の範囲第3項に記載の薄膜。
5. 架橋されたトランスフェリン誘導体を含む請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の薄膜。
6. トランスフェリンの誘導体がジスルフィド結合由来の硫黄原子に置換基を導入した誘導体である請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の薄膜。
7. トランスフェリン誘導体がカルボキシメチルトランスフェリンである請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の薄膜。
8. アルブミン誘導体がジスルフィド結合由来の硫黄原子に置換基を導入した誘導体である請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の薄膜。
9. アルブミン誘導体がカルボキシメチル化血清アルブミン、カルボキシメチル化コンアルブミン、及びN-アルキルサクシンイミド化血清アルブミンからなる群から選ばれる1又は2以上の誘導体である請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の薄膜。
10. 膜厚が $0.5\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ である請求の範囲第1項ないし第9項のいずれか1項に記載の薄膜。
11. プロテアーゼがマトリックスメタロプロテアーゼ7である請求の範囲第1項ないし第10項のいずれか1項に記載の薄膜。
12. プロテアーゼ活性の測定方法であって、
(1) 請求の範囲第1項ないし第10項のいずれか1項に記載の薄膜に対してプロテアーゼを含む試料を接触させる工程；及び

(2) プロテアーゼ活性により該薄膜に形成された消化痕を検出する工程を含む方法。

13. 薄膜を洗浄した後に消化痕を検出する請求の範囲第12項に記載の方法。

14. 薄膜を染料で染色した後に消化痕を検出する請求の範囲第12項又は第13項に記載の方法。

15. 試料が組織切片又は細胞を含む生体試料である請求の範囲第12項ないし第14項のいずれか1項に記載の方法。

16. 薄膜上の組織切片又は細胞の細胞核を、薄膜と識別できる色の染料で染色する工程を含む請求の範囲第15項に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02345

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/37, C12Q1/00, G01N33/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/37, C12Q1/00, G01N33/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DILOG)

WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97-32035, A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 04 September, 1997 (04.09.97) & EP, 884393, A & JP, 9-530799, A	1-16
A	WO, 95-34328, A (ROYER G P), 21 December, 1995 (21.12.95), Claim 28; page 7, lines 12 to 18; page 24, lines 14 to 20 & US, 5783214, A & EP, 765173, A & JP, 10-504281, A	1-16
A	ITO, H et al. "Purification and Refolding of Recombinant Human proMMP-7 (pro-Matrilysin) Expressed in Escherichia coli and Its Characterization" J. Biochem., Vol.119, (1996) pp.667-673	1-16
A	ASHCOM, J.D. et al. "Self-Quenched Fluorogenic Protein Substrates for the Detection of Cathepsin D and Other Protease Activities" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Vol.176 (1989) pp.261-264	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 April, 2001 (20.04.01)Date of mailing of the international search report
15 May, 2001 (15.05.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C12Q1/37, C12Q1/00, G01N33/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C12Q1/37, C12Q1/00, G01N33/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS(DIALOG)
WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/32035, A (富士写真フイルム株式会社) 4. 9月. 1997 (04. 09. 97) &EP, 884393, A&JP, 9-530799, A	1-16
A	WO, 95/34328, A (ROYER G P) 21. 12月. 1995 (21. 12. 95) 請求項 2 8, 第 7 頁第 1 2 - 1 8 行, 第 2 4 頁第 1 4 - 2 0 行 &US, 5783214, A&EP, 765173, A&JP, 10-504281, A	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
20. 04. 01

国際調査報告の発送日 15.05.01

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
山村 祥子



4N 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ITOH, M et al. "Purification and Refolding of Recombinant Human proMMP-7(pro-Matrilysin)Expressed in Escherichia coli and Its Characterization" J.Biochem., Vol. 119, (1996) p. 667-673	1-16
A	ASHCOM, J. D. et al. "Self-Quenched Fluorogenic Protein Substrates for the Detection of Cathepsin D and Other Protease Activities" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY Vol. 176 (1989) p. 261-264	1-16